

氏 名	澤 本 大 介
生 年 月 日	
本 籍	北海道
学 位 の 種 類	博士(理学)
学 位 記 番 号	博甲第 454 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 22 日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第 4 条第 1 項)
学位授与の題目	フィトクロムの構造と機能の解明を目指したフィコビルン誘導体の合成と反応
論文審査委員(主査)	猪股 勝彦(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	木下 英樹(理学部・教授) 宇梶 裕(自然科学研究科・助教授)
	中本 義章(自然科学研究科・助教授) 千木 昌人(工学部・助教授)

## 学 位 論 文 要 旨

**Abstract** Phytochrome is one of the major photosensory chromoproteins in plants and mediates a variety of light-responsive developmental processes in a photoreversible manner. The chromophore named phytychromobilin, which is covalently bound to apoproteins at A-ring through thioether, receives the photoinformation of environment by photoisomerization of the double bond between C- and D-rings. Little had been known about the structural requirements of the chromophore for holophytochrome functions, because of the difficulty of chemical synthesis of the chromophore.

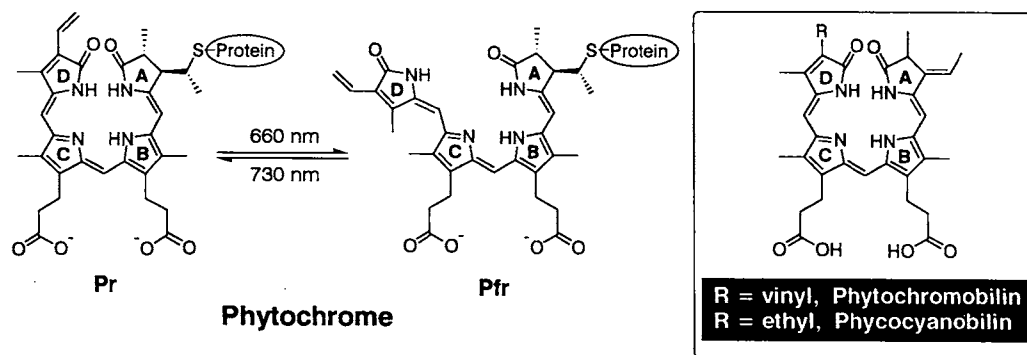
In the present study, the novel synthetic method of A-ring of the tetrapyrrole chromophore was developed, and it was successfully employed in the total syntheses of the various phycocyanobilin derivative modified at A-ring and propanoate side chains of B- and C-rings to reveal the structural requirement of the chromophore for spectral property of phytochrome B by *in vitro* assembly method.

An efficient synthetic method of the A/B- and C/D-ring components of phycobilin derivatives was also established by employing bilirubin as a starting material, which allows construction of the phycobilins including the modified phytychromobilin derivatives in a few steps.

The new Horner-Wadsworth-Emmons type reaction was examined to realize the coupling of the A/B- and C/D-ring components of phycobilin derivatives more efficiently.

Furthermore, a new method for the preparation of 5-tosylpyrrolinone as D-ring was also established starting from the  $\alpha$ -iodopyrrole derivative by the palladium catalyzed reaction.

植物内に存在する光受容色素タンパク質であるフィトクロムは、特定波長の光(660 nm および 730 nm)で可逆的に相互変換する二つの異性体 Pr および Pfr として存在し、植物の発生、生長、分化等の様々な光形態形成を調節する重要な役割を担っていることが知られている。

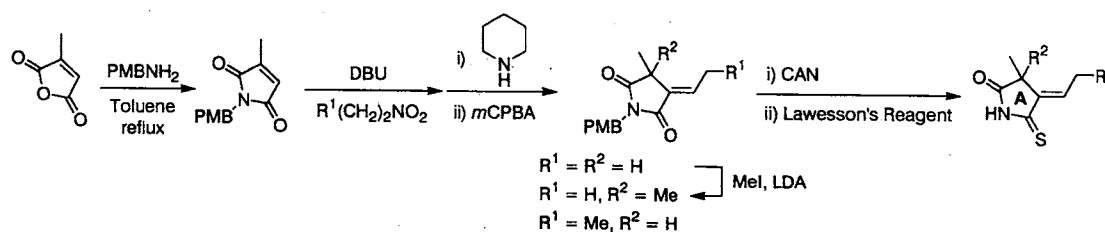


これまで、発色団であるフィトクロモビルンは、天然から得られているが極めて微量しか存在せず、精製も困難であった。一方、フィトクロモビルンは合成的にも入手が極めて困難であったため、当研究室では発色団の構造と再構成フィトクロムの機能の相関を明らかにする目的で、フィトクロムの再構成系に用いられるフィコシアノビルンやフィトクロモビルンの新規簡便合成法の開発について検討し、種々の誘導体を含め、それらの発色団の全合成に成功している。

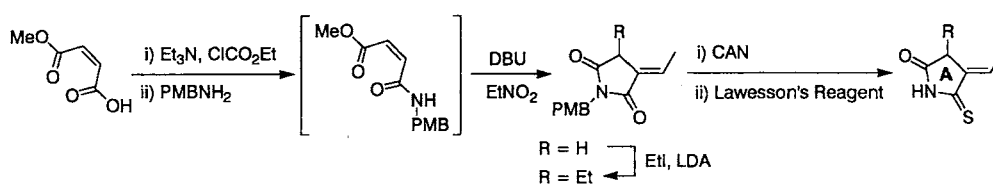
本研究では、特に A 環部分や B,C 環のプロパン酸残基を修飾したフィコシアノビルン誘導体の合成と、それらの合成発色団がアポタンパク質との相互作用やホロタンパク質の機能に及ぼす影響について検討した。また、種々のフィコビルン誘導体をより簡便かつ高効率的に合成する手法の開発を行った。

まず、フィコビルン誘導体の A 環部分の新規簡便合成法の開発と、A 環部分の置換基および B,C 環のプロパン酸残基を修飾した種々のフィコシアノビルン誘導体の合成を行った。

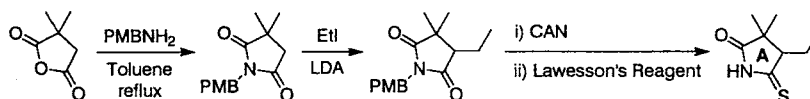
当研究室の渡部は、無水マレイン酸を出発物質として A 環部分を大量かつ簡便に合成する手法を確立している。本研究ではこの合成法を応用して、メチル基が既に一つ結合している無水シトラコン酸を出発物質として用いれば、メチル化という段階を経ることなく A 環部分の前駆体としてのスクシンイミド誘導体を簡便に合成することができると考え、検討を行った。その結果、無水シトラコン酸とアミンとの反応は開環と同時に閉環反応が進行し、一段階でシトラコンイミド誘導体を与えた。さらにニトロエタンと DBU を作用させることで容易にエチリデン基を導入することができた。この生成物は幾何異性体の混合物として得られたが、ピペリジンを用いさせ、次いで酸化して脱離させることで目的とする異性体へ変換することができた。さらにこの合成法を応用し、メチル基をもう一つ導入した誘導体やプロピリデン基を導入した誘導体も合成することができた。



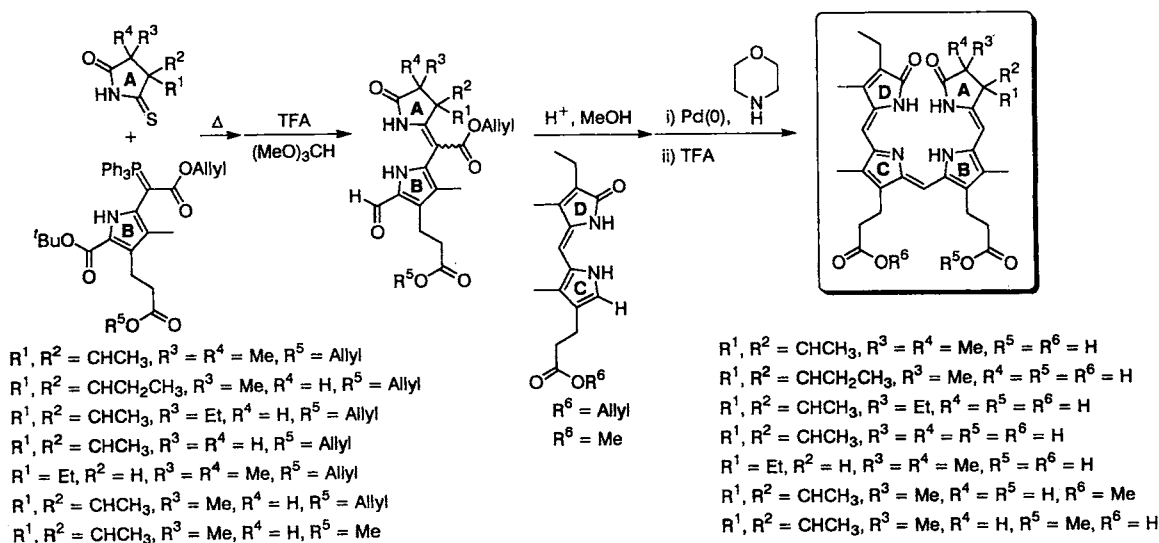
また、無水マレイン酸の代わりにマレイン酸モノメチルを用いることで容易にスクシンイミド誘導体を調製し、メチル化の代わりにエチル化もしくは置換基を導入しないことで、A 環部分を修飾した。



さらに、無水 2,2-ジメチルコハク酸を出発物質として、エチリデン基が還元された誘導体を合成した。



上式で示したように、これらのスクシンイミド誘導体の窒素上の保護基を脱保護し、モノチオカルボニル化することで A 環へと変換し、次式で示したように B 環部分との thio-Wittig 型カップリング反応により AB 環を合成した。得られた AB 環の *t*-ブチルエステルを TFA で除去し、続いてオルトギ酸メチルを加えることでホルミル化し、さらに CD 環とメタノール中酸性条件下で縮合させることによりテトラピロール誘導体へと導いた。最後に、パラジウム触媒存在下モルホリンを作用させることでアリルエステルを脱保護し、TFA による AB 環メソ位の脱炭酸を経て、目的とする種々の置換基を修飾したフィコシアノビルリン誘導体を合成することに成功した。



次に、入手容易な胆汁色素であるビリルビンを出発物質としたフィコビルリン誘導体の高効率の構築法の開発を行った。すなわち、ビリルビン誘導体の AB 環と CD 環の架橋部分を開裂させることができれば、当研究室で開発されたビニル基を有する AB 環前駆体をエチリデン基を有する AB 環へ極めて短いステップ数で変換することができ、CD 環はそのままフィトクロモビルリン誘導体の前駆体として利用できるものと考え、検討を行った。

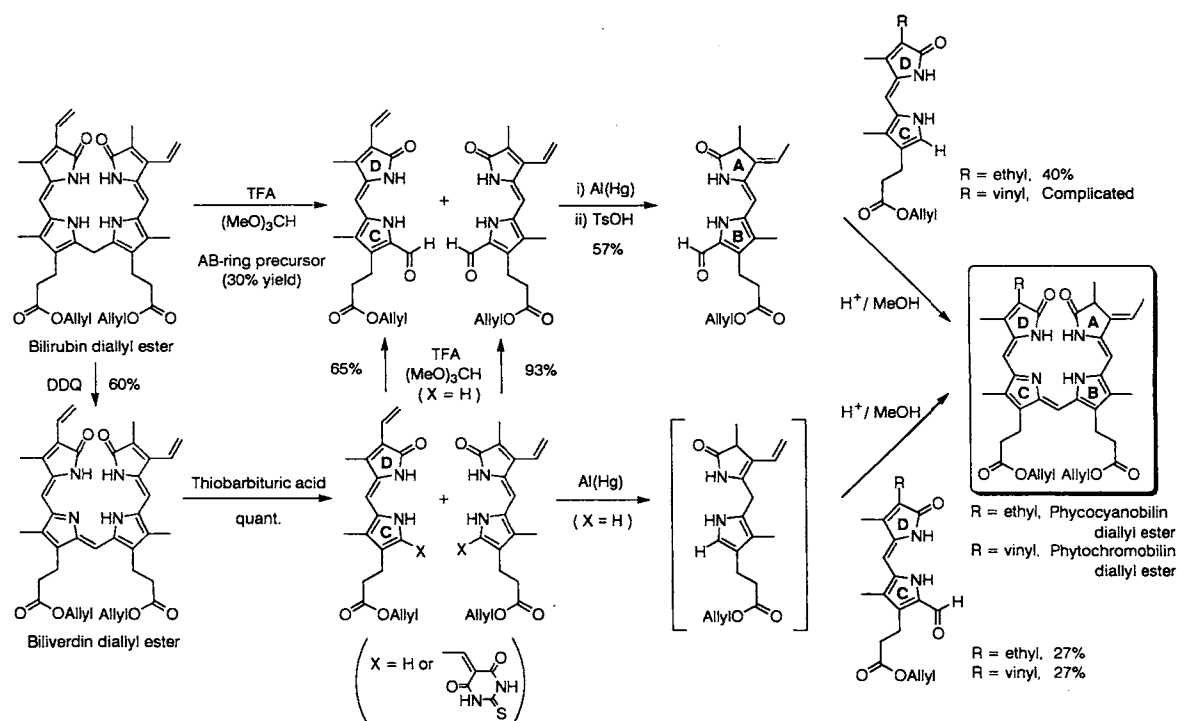
まず、市販のビリルビンを DBU とヨウ化メチルもしくは臭化アリルを用いてジメチルエステルあるいはジアリルエステルとし、これらに TFA とオルトギ酸メチルを作用させたところ、酸による開裂とホルミル化反応が同時に進行し、低収率ながら AB 環のホルミル体を得ることができた。

また、ビリルビンジエステルを酸化してビリベルジンジエステルとし、チオバルビツール酸を

作用させると付加反応に引き続いて開裂反応が進行し、AB 環と CD 環を定量的に得ることができた。更にこれらに TFA とオルトギ酸メチルを作用させることでホルミル体を得ることができた。

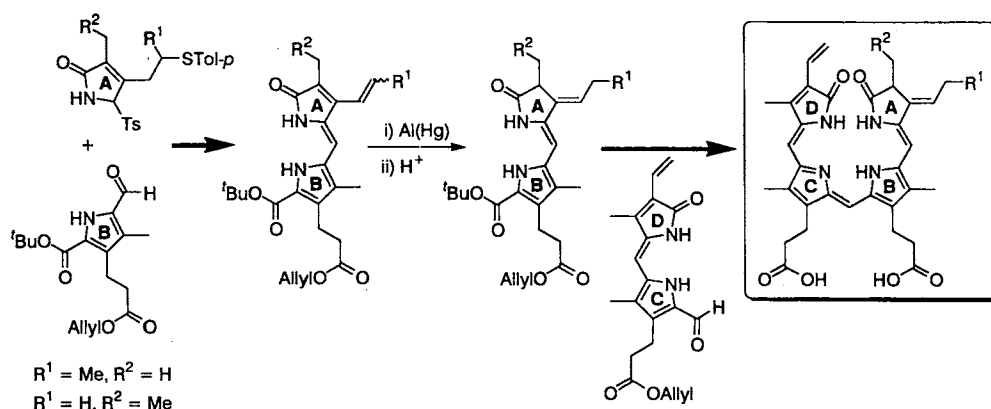
得られた AB 環のホルミル体は、アルミニウムアマルガムを用いてジエノン部分を還元し、酸触媒で異性化させることによりフィコビリン誘導体の AB 環へと変換することができた。これを別途調製した CD 環とメタノール中、酸触媒を用いてカップリングさせたところ、フィコシアノビリン誘導体に関しては低収率ながら合成することができたが、フィトクロモビリン誘導体に関しては目的物を得ることができなかった。

そこで AB 環をホルミル化せずに CD 環のホルミル体と縮合する手法を検討した。すなわち、ホルミル化されていない AB 環前駆体をアルミニウムアマルガムで還元した後、酸で異性化することなくそのまま酸性条件下でのカップリング反応に用いたところ、低収率ながらフィトクロモビリン誘導体やフィコシアノビリン誘導体を合成することができた。

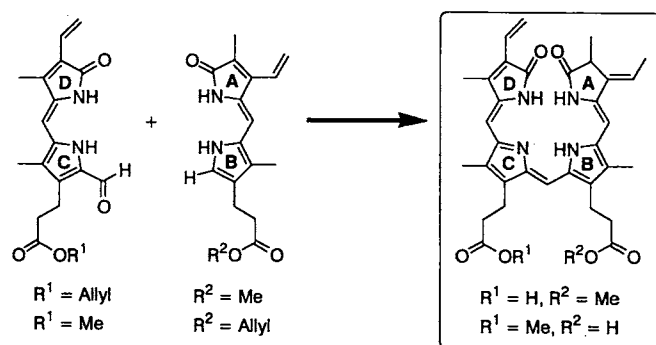


さらに上で述べた手法に従って得られる AB 環や CD 環を用いた、修飾置換基を有するフィトクロモビリン誘導体の合成についても検討した。

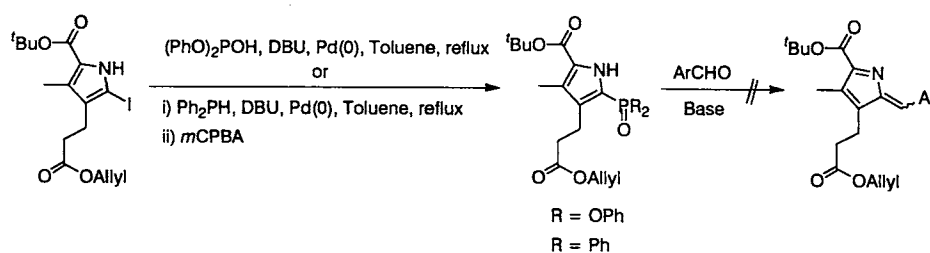
まず、当研究室で開発された、トリルチオエチル基をビニル基等価体として用いるフィトクロモビリン誘導体の AB 環の合成法を応用して、A 環となる 5-トシルピロリノン誘導体の置換基を修飾し、B 環に相当するホルミルピロール誘導体と縮合して AB 環を合成した。これをビリルビンを出発物質として得られる CD 環のホルミル体とカップリングすることで、A 環の置換基を修飾したフィトクロモビリン誘導体のジアリルエステルを合成することができた。現在、遊離のフィトクロモビリン誘導体を合成することについて検討中である。



次に、ビリルビンからビリベルジンジエステルを経由して得られる AB 環と CD 環のメチルエステルとアリルエステルを組み合わせ、プロパン酸残基の片方をメチルエステル、もう一方をアリルエステルとしたフィトクロモビルン誘導体を合成した。現在、アリルエステルを脱保護して一方が遊離のカルボン酸であるフィトクロモビルン誘導体の単離・精製について検討中である。

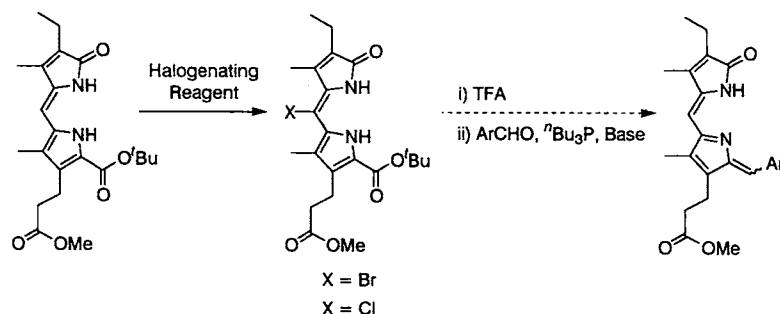


次に、フィコビルン誘導体の AB 環と CD 環の新規縮合法について検討した。すなわち、酸性条件下の縮合は未だ満足な収率で目的物が得られない場合が多いため、塩基性条件下で進行する Horner-Wadsworth-Emmons 型反応を応用する新規縮合法の開発を目指して、まずピロール誘導体にリン官能基を導入することを検討した。その結果、 $\alpha$ -ヨードピロール誘導体に DBU とパラジウム触媒存在下、亜リン酸ジフェニルあるいはジフェニルホスフィンを作用させたところ、ジフェニルホスホ基もしくはジフェニルホスフィニル基を導入することができた。しかし、これらのピロール誘導体と芳香族アルデヒドとのカップリング反応は全く進行しなかった。

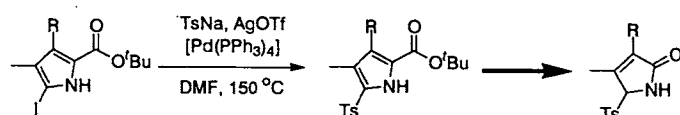


そこで、すでに C 環と D 環のカップリングにおいて満足な結果を得ているホスホニウムイリドを経由する Wittig 型縮合法として、CD 環にハロゲン原子を導入し、塩基とトリブチルホスフィンを作用させて系内でホスホニウムイリドを形成することができれば、アルデヒドとの縮合が

可能になると考え、検討した。C 環の  $\alpha$  位に *t*-ブチルエステルを有する CD 環にハロゲン化剤を作用させると、CD 環のメソ位がハロゲン化されることを見出した。現在、このメソ位がハロゲン化された CD 環を用いる Wittig 型縮合法について検討中である。



次に、 $\alpha$ -ヨードピロール誘導体にトシル基を導入し、D 環となるピロリノン誘導体へ変換する手法について検討した。すなわち、上で述べた手法を応用して、パラジウム触媒および銀トリフレートが存在下、*p*-トルエンスルフィン酸ナトリウムを作用させることで、種々のヨードピロール誘導体のヨウ素をトシル基に置換することができた。得られたピロール誘導体の *t*-ブチルエステルを TFA で脱保護し、塩基存在下ヨウ素とヨウ化カリウムでヨウ素化し、銀塩存在下、TFA と水による酸加水分解によりピロリノン誘導体へと変換することができた。アセチルチオエチル基を有する誘導体に関しては、ヨウ化物を還元した後に臭素化してピロリノン誘導体へ変換することにより、ステップ数は増えるものの、これまでの手法では合成が困難であった誘導体を合成することができた。今後、更に効率のよい変換法を検討する予定である。



最後に、共同研究者（日立製作所基礎研究所、古谷雅樹、半澤宏子）により、遺伝子工学の手法を用いて調製されたアポタンパク質と、上で合成したフィコシアノビルリン誘導体との再構成実験が行われ、A 環の置換基の炭素数を増やせば結合効率が良くなることから、A 環部分がアポタンパク質の疎水性ポケットに取り込まれていることを明らかにした。また、B,C 環のプロパン酸残基のエステル化による保護は、再構成の効率およびホロタンパク質の光可逆性に影響を及ぼし、プロパン酸残基が再構成においても、また機能発現においても非常に重要な役割を果たしている可能性が高いことが判明した。さらに、A 環部分にアポタンパク質との共有結合部位を有しない誘導体も、弱い相互作用でアポタンパク質中に取り込まれ、光可逆性を示すという大変興味深い事実を見出すことができた。

以上述べたように、本研究では、A 環および B,C 環のプロパン酸残基を修飾した種々のフィコシアノビルリン誘導体の合成に成功するとともに、アポタンパク質との再構成実験においてもフィトクロム中における発色団の立体的要請に関する興味深い知見を得ることができた。また、ビリルビンを出発物質とするフィコビルリン誘導体の高効率の構築法を確立し、種々のフィコビルリン誘導体を合成するための AB 環や CD 環を簡便に供給することができるようになった。今後は、光活性基も含めたさらに新規な置換基の導入の検討、種々の置換基を修飾したフィトクロモビルリン誘導体の合成のほか、引き続きフィコビルリン誘導体の AB 環と CD 環の簡便な縮合法の開発について検討していく予定である。

## 学位論文審査結果の要旨

本学位論文に対して、各審査委員が参考論文等の関連資料を含めて予備審査を行い、さらに平成 14 年 2 月 4 日の口頭発表における質疑応答（最終試験に代える）の結果を踏まえ、同日開催された審査委員会において以下の通り判定した。

本論文は、植物の発生や成長、分化等の光形態形成を制御している光受容色素蛋白質フィトクロムの構造と機能の解明を目指して、その発色団であるフィトクロモビルン (PΦB) や類似の骨格を有するフィコシアノビルン (PCB) 及びそれらの誘導体の新規簡便合成法の開発とアポ蛋白質との再構成実験の結果について述べている。

すなわち、(1) A 環部分の新規一般合成法の開発、(2) B, C 環側鎖のプロパン酸を位置選択的にモノメチルエステル化した PCB 誘導体の合成、(3) 入手容易なビリルビンを出発物質とする高効率な PΦB 及び PCB 誘導体の合成、さらに、(4) D 環となるピロリノン誘導体の新規合成法の開発、について検討し、いずれも好結果を得ている。得られた遊離のフィコビルン誘導体は、試験管内でアポ蛋白質 (PHYB) と再構成実験が行われ、発色団の結合効率及び、得られたフィトクロム B ホロ蛋白質 (PhyB) の光可逆的吸収変化を測定して、(5) 発色団の各側鎖の役割を解析した。特に A 環 2 位がジメチル化された発色団の結果から、2 位の立体化学は余り重要でないことや、8 位のプロパン酸側鎖がアポ蛋白質との再構成及び PhyB の光可逆性発現にとって重要であること、3, 3'位の還元体もアポ蛋白質に取り込まれ、光変換機能を示すことなど、注目すべき事実を発見した。

上述したように、本論文は、有機化学と生物学の学際領域の発展に大きく貢献する成果を挙げており、博士（理学）の学位を与えるに充分値するものと判定した。